

*А. А. Стекольников, К. Г. Николаев, Е. В. Скорб*  
Научно-образовательный центр инфохимии,  
Национальный исследовательский университет ИТМО  
e-mail: aastekolshchikova@itmo.ru

## **ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКИЙ ИММУНОФЕРМЕНТНЫЙ АНАЛИЗ ВИРУСОВ\***

По мере роста стоимости здравоохранения и старения населения в мире, возникает необходимость в персонализированных устройствах для постоянного мониторинга состояния здоровья человека, пока пациенты находятся вне больницы. С точки зрения неинвазивного экспресс-мониторинга полностью интегрированная платформа, основными узлами которой являются электрохимический сенсор, измерительное устройство (потенциостат) и прикладное программное обеспечение, является перспективным устройством, которое может предоставить достаточную и точную информацию для мониторинга здоровья и даже предварительный медицинский диагностики.

Современные методы лабораторной диагностики не представляют возможностей для миниатюризации и, следовательно, перехода к персонализированной медицине. Также методы имеют ограничения, связанные с длительным временем анализа, стоимостью, и требованиями к проведению анализа высококвалифицированным персоналом.

Первым направлением данного исследования является разработка простых и экономически эффективных подходов для изготовления неинвазивных электрохимических сенсоров с высокой чувствительностью, хорошей воспроизводимостью и стабильностью. Разрабатываемые сенсоры используются для определения вирусов, и в качестве модельного объекта для анализа исследуется вирус клещевого энцефалита.

Для электрохимического иммуноферментного анализа, на основе специфических взаимодействий антитело-антиген целевого вируса, используются

---

\* © Стекольников А.А., Николаев К.Г., Скорб Е.В., 2021

электроды, модифицированные нанослоями полиэлектролитов, так как полиэлектролиты обладают свойствами, близкими к белковым структурам. Изоляция чувствительного слоя антител от анализируемого раствора адсорбированными слоями полиэлектролитов позволяет предотвратить неспецифические взаимодействия путем электростатического отталкивания. При этом сохраняется взаимодействие антиген целевого вируса – антитело. Таким образом достигается селективность предлагаемых сенсоров.

В качестве электрода для модификации используется печатный углеродный электрод, так как макромолекулы обладают сродством к физической адсорбции на поверхности такого материала.

Рисунок 1 подробно иллюстрирует принцип работы и изготовления иммуносенсора и разделен на три части, причем 1 шаг — это изготовление иммуносенсора, а 2 и 3 шаг — это шаги, необходимые для процесса обнаружения вируса. Первый этап включает модификацию электрода полиэлектролитами (PEI, PSS) и антителам (AB). Второй этап – это изготовление иммунопробы, когда анализируемый образец адсорбируется непосредственно на поверхность электрода. Третий этап предполагает активацию электрода для количественной реакции между адсорбированными антигенами вируса и ферментом пероксидазой конъюгированной с вторичными антителам (AB-HRP). Используемый «сэндвич»-метод анализа основан на использовании редокс-активных меток, конъюгированных вторичными антителами. При связывании специфического антигена и следующего сигнального антитела обнаруживается увеличение или уменьшение тока редокс-активной молекулы. В качестве редокс-активного зонда была выбрана пероксидаза хрена, поскольку данный фермент меньше, стабильнее и дешевле, чем другие альтернативы. Пероксидазное действие использовалось для каталитического разложения  $H_2O_2$  с образованием  $\cdot OH$ , а затем окисления  $OH$ , вызывая тем самым изменение текущего сигнала сенсора.

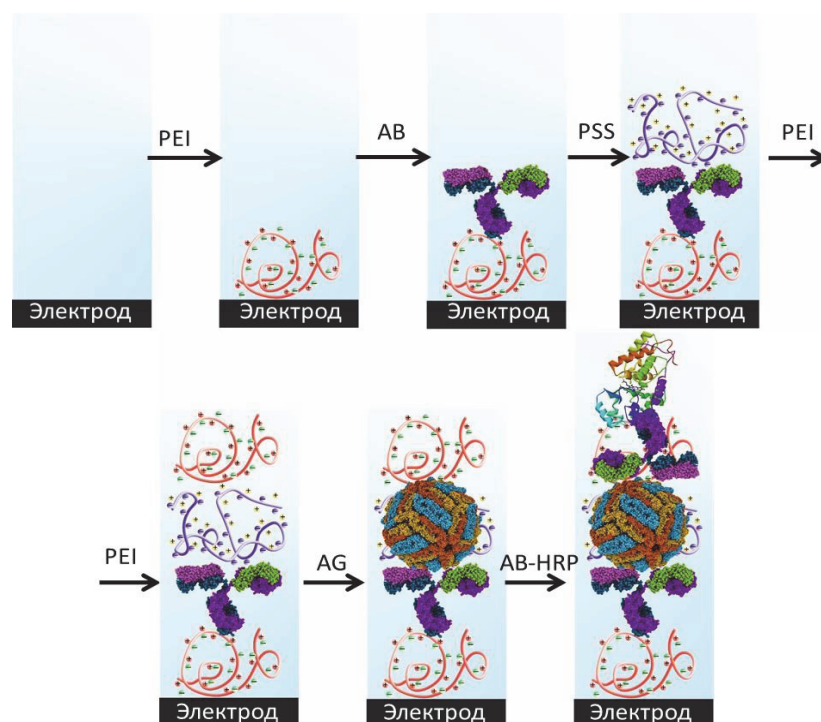


Рис. 1. Схема адсорбции слоев полиэлектролитов (PEI и PSS), антител к вирусу клещевого энцефалита (AB), антигенов вируса клещевого энцефалита (AG) и конъюгатов антител с пероксидазой хрена (AB-HRP)

На рис. 2 а приведены результаты измерений для однократной добавки пероксида водорода к печатному углеродному электроду при адсорбции антигена из раствора  $10^3$  частиц/мл.

Градуировочная зависимость для серии печатных электродов по разности тока при адсорбции антигена из растворов различного разбавления показала линейный диапазон определяемых концентраций от  $10^3$  до  $10^9$  частиц/мл (рис. 2 б).

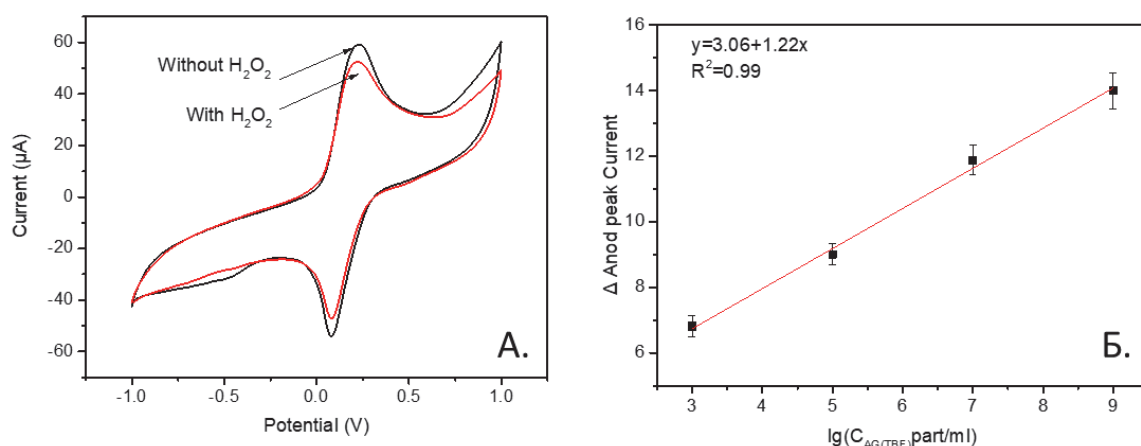


Рис. 2. *а* – Аналитический сигнал (циклическая вольтамперограмма) при добавлении  $10^{-4}$  моль/мл  $\text{H}_2\text{O}_2$  в электрохимическую ячейку при  $10^3$  частиц/мл вируса клещевого энцефалита; *б* – Градуировочная зависимость для разности токов между токами до и после добавления  $10^{-4}$  моль/мл  $\text{H}_2\text{O}_2$  в диапазоне концентраций вируса клещевого энцефалита от  $10^3$  до  $10^9$  частиц/мл

Иммуносенсор демонстрирует широкий аналитический диапазон от  $10^3$  до  $10^9$  частиц/мл. Чувствительность такого электрохимического иммуносенсора была рассчитана как  $1.20 \pm 0.06$  мкА/лгС. Установленное линейное уравнение имеет вид  $y = -3.06 + 1.22x$  ( $R^2 = 0.9937$ ). Предел обнаружения составляет  $1.6 \cdot 10^1$  частиц/мл.

Таким образом, показана возможность использования печатных электродов, модифицированных полиэлектролитными слоями и специфическими антителами в широком диапазоне определения концентраций вируса.

Высокая чувствительность, низкая стоимость, простота конструкции, относительная простота использования разрабатываемых сенсорных датчиков могут обеспечить широкий спектр применения в персонализированной медицине.

*При поддержке гранта РФФИ 20-04-60495 Вирусы, а также гранта Университета ИТМО на проведение ПО НИОКР.*